Münster 1936_No 62 Phil DiSS

Ueber die Reinigung der Carboxylase und Invertase.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster.

Vorgelegt von

Otto Schaefer

aus Schöningen (Braunschweig)

1934

Meinem Vater gewidmet.

Ueber die Reinigung der Carboxylase und Invertase.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster.

Vorgelegt von

Otto Schaefer

aus Schöningen (Braunschweig)

1934

CARL ERMACORA, HANNOVER

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 1934.

Dekan: Herr Prof. Dr. Baumstark.

Referent: Herr Prof. Dr. Langenbeck.

Korreferent: Herr Geheimrat Prof. Dr. Schenck.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis.

A. Einleitung. Seite

B. Hauptteil:

I. Carboxylase.

a) Theoretischer Teil 9
1. Befreiung von Invertase 10
2. Prüfung auf Maltase 12
3. Prüfung auf Protease 13
4. Allgemeine Reinigung der Carboxylase 14
b) Versuchsteil 15

II. Invertase.

a) Theoretischer Teil 31
b) Versuchsteil 34

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555428_0044

Ueber Reinigung der Carboxylase und Invertase.

A. Einleitung.

Bei Durchsicht der Fermentliteratur fällt auch bei dem heutigen neuesten Stande der Fermentforschung immer wieder ins Auge, daß man bei allen Fermenten wohl ihre Funktionen und ihren Wirkungsmechanismus kennt, aber von keinem die wirkliche chemische Struktur. Sämtliche Theorien hierüber sind so gut wie unbewiesen, da es noch nicht gelungen ist, ein Ferment zu isolieren. Willstätters Theorie besagt, daß das Molekül eines Enzymes aus einem kolloidalen Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe zusammengesetzt ist. Der kolloidale Träger ist entbehrlich, wenn dem Enzym ein anderer geeigneter zur Verfügung steht. Man hat aber eine Trennung von aktiver Gruppe und kolloidalem Träger unter Erhaltung der Wirksamkeit noch nicht herbeiführen können. Dieser Theorie liegen die Beobachtungen zugrunde, die Willstätter bei der Reinigung von Fermenten, insbesondere der Sacharase gemacht hat. — Eine andere wichtige Theorie stellte H. v. Euler auf. Es ist dies die sogenannte „Zwei-Affinitäts-Theorie", die den Fermenten zwei wirksame Gruppen zuschreibt, von denen die eine die Bindung des Substrates, die andere den weiteren Umsatz bestimmt. Auch dieser Theorie liegen analytische Forschungen zugrunde.

Während sich Willstätter und v. Euler auf rein analytische Reinigungsarbeiten stützen, bringen Langenbeck und Mitarbeiter als neu die S y n t h e s e für ihre Theorie in Anwendung, wobei sie sich im allgemeinen an Willstätter anlehnen, sich jedoch speziell eingehend mit der reaktionsfähigen Gruppe beschäftigen. Diese wird mit prostetischer Gruppe bezeichnet, und man nimmt an, daß sie ein großes Molekül ist und sich aus einer oder wenigen aktiven und einer größeren Anzahl aktivierenden Gruppen zusammensetzt. Letztere reagieren nicht unmittelbar mit dem Substrat, sondern bleiben während der Fermentreaktion unverändert. Ihre Anteilnahme am Reaktionsverlauf besteht nur darin, daß sie der aktiven Gruppe, die unmittelbar mit dem Substrat in Reaktion tritt, die Wirksamkeit vermitteln.

Langenbeck verfolgte diese Theorie an seinen Carboxylasemodellen, indem er die Modelle, die in mehreren Eigenschaften mit der Carboxylase eine überraschende Aehnlichkeit zeigten, syste-

matisch durch neu eingeführte Gruppen aktivierte. Diese Methode der Konstitutionsaufklärung, die ein Modell konstruiert und seine Eigenschaften möglichst eingehend mit denen des Fermentes vergleicht, bringt unbedingt ein neues wichtiges Moment in die Fermentforschung. Sie vermittelt ein stark anschauliches Bild von der wahrscheinlichen Zusammensetzung des Fermentes und gibt wichtige Aufschlüsse über seinen Wirkungsmechanismus. Ob auf diesem Wege allein eine Aufklärung möglich sein wird, scheint dagegen zweifelhaft, da man selbst von einem Modell, das sich in allen seinen Eigenschaften und Wirkungen mit denen des Fermentes genau deckt, schwerlich behaupten kann, es sei mit dem Ferment identisch. Denn dazu gehört ein dem Modell gleichwertiges Vergleichsobjekt, d. h. ein Fermentpräparat mit einem solchen Reinheitsgrad, daß es auch tatsächlich die charakteristischen Eigenschaften des betreffenden Fermentes erschöpfend verkörpert. Dies ist nur auf dem analytischen Reinigungswege zu erreichen, und es scheint daher ratsam, an die Konstitutionsaufklärung der Fermente von zwei Seiten heranzugehen, nämlich einmal s y n t h e t i s c h durch Aufbau von Fermentmodellen und zweitens a n a l y t i s c h durch Herstellung von hochgereinigten Präparaten. Der letzte Weg ist in der vorliegenden Arbeit beschritten. Es soll im ersten Teil die Reinigung der Carboxylase, im zweiten die der Invertase behandelt werden.

B. Hauptteil.

I. Carboxylase.

a) Theoretischer Teil.

Die Carboxylase ist ein Ferment, das α-Ketosäuren in CO_2 und den Aldehyd der nächst niederen Kohlenstoffreihe zerlegt. Auf diese ihre typische Fermentwirkung gründen sich ihr Nachweis und die Bestimmungsmethoden. Es wird entweder die abgespaltene Menge Aldehyd ermittelt oder die entwickelte Menge CO_2 gemessen. Die Bestimmung, bei der die CO_2-Entwicklung gemessen wird, ist der anderen vorzuziehen, weil der Aldehyd nicht selten sekundäre Umwandlungen erleidet und dadurch Ungenauigkeiten entstehen.

Die Carboxylase findet sich sowohl in niederen Organismen als auch in höheren Pflanzen. So wurde sie in den Schimmelpilzen von W. Zaleski[1]), in den Coliarten von G. Wagner[2]) und in der Willia anomala sowie verschiedenen Stämmen von Cladosporium von Fr. Boas[3]) nachgewiesen. Nach C. Neuberg[4]) und F. Windisch[5]) kommt sie auch in den Essigbakterien vor. In den höheren Pflanzen, so im Weizen, in Erbsen, Lupinen, Kartoffeln und Zuckerrüben, ist die Carboxylase von J. Bodnar[6]), Fr. Boas[7]) und Zaleski[8]) entdeckt.

Als Ausgangsmaterial für Reinigungszwecke eignet sich am besten untergärige Brauereihefe, in der die Carboxylase zusammen mit sehr vielen anderen Fermenten enthalten ist.

Es wurde nun nach zwei Gesichtspunkten an die Reinigung der Carboxylase herangegangen. Zunächst versuchte man, sie von den wichtigsten Begleitfermenten, wie der Sacharase, der Maltase und den Proteasen, zu befreien — in diesem Falle wurde bei gleich-

---

[1]) W. Zaleski, Ueber die Verbreitung der Carboxylase in den Pflanzen, Chem. Cbl. 1914, I, 1961.

[2]) G. Wagner, Paratyphusbakterien ohne Gasbildungsvermögen, Cbl. Bakt. Abt. I, 71, 25 (1913).

[3]) Fr. Boas, Mykologische Notizen, Chem. Cbl. 1916, I, 431.

[4]) und [5]) Neuberg und Windisch, Ueber die Essigsäuregärung und die chemischen Leistungen der Essigbakterien, Biochem. Z. 166, 454 (1925).

[6]) Bodnar, Ueber die Zymase und Carboxylase der Kartoffel und Zuckerrübe, Biochem. Z. 73, 193 (1915).

[7]) Boas, a. a. O.

[8]) Zaleski, Ueber die Carboxylase bei höheren Pflanzen, Biochem. Z. 47, 184 (1912).

bleibender Carboxylasewirkung die Abnahme der übrigen Fermente verfolgt und gemessen — und, nachdem dieses erreicht war, arbeitete man lediglich auf eine ganz allgemeine Befreiung von den übrigen Stoffen bei Aktivitätssteigerung bzw. Aktivitätserhaltung der Carboxylase hin, ohne den verschwindenden Stoffen weiter irgendwelche Beachtung zu schenken.

1. Befreiung von der Invertase.

Um die Invertase von der Carboxylase abzutrennen, fand die Adsorptionsmethode der Münchner Schule unter den verschiedensten Versuchsbedingungen Anwendung, immer dahin zielend, einen Weg zu finden, bei dem das eine Ferment adsorbiert, das andere im Hefesaft in seiner vollen Wirksamkeit erhalten blieb. Das Vorhandensein bzw. das Verschwinden der Invertase wurde auf Grund ihrer typischen Fermentwirkung, der Spaltung des Rohrzuckers in Glukose und Fruktose polarimetrisch gemessen unter Benutzung der von Willstätter und Steibelt ausgearbeiteten Vergleichszeitwertmethode. Der Ausgangssaft war ein durch Mazeration aus Brauerei-Unterhefe hergestellter Rohsaft, bei dem zunächst zum Ausfällen von Eiweiß eine Adsorption mit Kaolin stattfand. Dieser Kaolinadsorbierte Saft wurde auf seinen Carboxylase und Invertasegehalt geprüft und als Normalsaft angenommen, d. h. seine Carboxylase- und Invertasewerte gleich 100 % gesetzt und alle weiteren Messungen hierauf bezogen. Nun schloß sich eine Tonerdeadsorption an, bei der die Menge der Tonerde variiert wurde. Es ergab sich, daß bei Verwendung von geringen Mengen Tonerde die Aktivität ungefähr auf der gleichen Stufe blieb, um dann bei Anwendung von mehr Tonerde abzufallen, jedoch letzteres nur bis zu einer gewissen Grenze. Das ph, bei dem man arbeitete, betrug 4,8; eine zur sauren Seite hin vorgenommene Aenderung ergab keine wesentlichen Unterschiede. Jedenfalls war auf diese Weise eine Abtrennung der Invertase nicht zu erreichen.

Jetzt folgte eine wichtige Versuchsänderung, die sich infolge der Unbeständigkeit der Carboxylase als notwendig erwies. Wie die Zymase, so zeigt auch ihre Komponente, die Carboxylase, in hohem Maße die Eigenschaft, schon nach kurzer Zeit ihre Aktivität zu verlieren. Dieser Umstand erschwert natürlich die Reinigung enorm, zumal er sich gerade bei reineren Säften am stärksten zeigt. FF. Nord machte nun die Beobachtung, daß die Zymase sich im eingefrorenen Zustande lange unverändert hält. Diese Methode wurde daher auf die Carboxylase übertragen. Als Nachteil der Arbeitsweise stellte sich ein ziemlich bedeutender Zeitverlust heraus, bedingt durch das Auftauen größerer Saftmengen. Ferner ergab sich ein Aktivitätsverlust durch das Auftauen, da das Ferment schon

bei 0° langsam zugrunde geht. Es wurde daher ein Zusatzmittel gesucht, um die Säfte auch bei — 20° noch flüssig zu erhalten. Als geeignet erwies sich Methanol, das ähnliche Lösungseigenschaften wie das Wasser besitzt, eine starke Gefrierpunkterniedrigung gibt und wegen seines niedrigen Siedepunktes leicht wieder aus der Lösung zu entfernen ist. Die Gefrierpunkterniedrigung des Wassers durch ½ Volumen Methanol beträgt — 22°. Diese Mischungen sind nun bei der ganzen Reinigung beibehalten worden, und es zeigte sich, daß bei der Temperatur von — 22° die Aktivität der Carboxylase erhalten blieb.

Natürlich erfolgten jetzt auch die Abtrennungsversuche der Invertase in methanolhaltigen Säften. Dabei erwies sich als großer Vorteil, daß bei Zusatz des Methanols ein großer Teil der Eiweißstoffe ausfiel und abzentrifugiert werden konnte, während die Carboxylase in Lösung blieb. Der methanolische Rohsaft wurde ebenso wie der wässrige vorher mit Kaolin adsorbiert und sein Sacharasewert mit 100 % bezeichnet. Es zeigte sich dabei, daß der Sacharasewert des methanolischen mit Kaolin adsorbierten Rohsaftes höher war, als der des wässrigen Saftes. Dies ist wahrscheinlich so zu erklären, daß durch den Zusatz von Methanol irgendwelche Hemmungskörper mitgefällt werden. — Die nun zunächst wieder durchgeführten Adsorptionsversuche mit Tonerde blieben jedoch erfolglos. Der Sacharasegehalt nahm zwar entsprechend der angewandten Menge Tonerde langsam ab, jedoch verblieben nach der Adsorption mit größeren Mengen Tonerde noch immer 59 % Sacharase in Lösung. Es ist also auf diesem Wege nicht möglich, die Invertase zu beseitigen.

Die nun folgenden Versuche sind grundlegend durch Wechsel des Adsorptionsmittel geändert worden. Es kam jetzt eine methanolische Tanninlösung in Anwendung, die von vornherein den Vorteil hatte, sämtliches Eiweiß zu fällen. Es folgte wieder eine Versuchsreihe mit verschiedener Anzahl ccm Tanninlösung, dabei zeigte sich, daß auf diese Weise schon eine wesentlich stärkere Adsorption der Invertase stattfand. Die Adsorptionsversuche, die mit 0,5, 1 und 2 ccm 5prozentiger Tanninlösung auf 10 ccm Saft durchgeführt wurden, ergaben einen Abfall an Invertase von 88 % bei 0,5 Tanninlösung, auf 23 % bei Anwendung von 1 ccm Tanninlösung. Noch größere Mengen Tanninlösung durften bei der Adsorption nicht verwendet werden, weil die damit bedingte starke Gelbfärbung des Saftes die Polarisation zu sehr störte. Weitere Adsorptionen mit noch höherer Konzentration des Adsorptionsmittels waren auch unnötig, da die parallel laufenden Carboxylasemessungen ein Verhalten der Carboxylase gegen Tannin zeigten, das eine Trennung auf diese Weise unmöglich machte. Die Aktivität der Carboxylase steigt

nämlich durch die Adsorption mit geringen Tanninmengen stark an, um dann bei Anwendung größerer Tanninmengen steil abzufallen. Eine Trennung von Carboxylase und Invertase auf diesem Wege ist dadurch unmöglich, da eine Adsorption der Invertase erst durch wesentlich größere Mengen Tanninlösung stattfindet. Der nun eingeschlagene Weg ließ eine Anzahl Adsorptionen aufeinander folgen und schloß dann eine Elution an. Der mit Kaolin adsorbierte methanolische Ausgangssaft wurde zunächst wieder mit Tannin gefällt. Die Tanninmenge war so gering gewählt, daß Carboxylase nicht mit ausfiel. Anschließend erfolgte eine Adsorption mit Tonerde, nachdem vorher das überschüssige in Lösung verbliebene Tannin mit Hautpulver entfernt war. Die Tonerdeadsorption zielte diesmal dahin, die Carboxylase möglichst ganz an das Adsorbat zu bekommen und die Invertase in Lösung zu lassen. Die Carboxylase sollte dann durch eine Elution von dem Tonerdeadsorbat wieder abgelöst werden. Es zeigte sich, daß dieser Weg richtig war. Die Elution besaß volle Carboxylasewirkung, war aber gänzlich frei von Invertase. Die Tonerdeadsorption erfolgte mit 2 ccm auf 10 ccm Saft, gewaschen wurde das Adsorbat mehrmals gründlich mit 30-prozentigem Methanol, eluiert mit Phosphat, und zwar bei — 20 °. In welcher Stufe des Arbeitsganges die restlose Abtrennung der Invertase vor sich ging, ist nicht genau verfolgt worden. Es ist aber anzunehmen, daß die Abnahme nach und nach erfolgte, so daß der letzte Rest wohl noch mit an das Adsorbat ging, aber nicht mehr mit eluiert wurde.

Damit war die Abtrennung der Invertase von der Carboxylase gelungen, und nun richtete sich das Augenmerk auf ein anderes Begleitferment der Carboxylase im Hefemazerationssaft, nämlich die Maltase.

2. Prüfung auf Maltase.

Die Maltase, die außer in der Hefe, in der sie am leichtesten zugänglich ist, in tierischen und pflanzlichen Organismen, so z. B. in Schimmelpilzen, im Malz, im Speichel und im Darm vorkommt, ist ein Ferment, das die Spaltung des Malzzuckers oder der Maltase in zwei Molekülen Traubenzucker bewirkt. Im Gegensatz zur Invertase ist die Maltase außerordentlich unbeständig. Zur Messung diente wieder die spezifische Fermentwirkung, d. h. die Spaltung des Malzzuckers, wobei die Drehung polarimetrisch gemessen wurde. Die Methode ähnelt also stark der der Invertasemessung. Ein wichtiger Unterschied besteht nur darin, daß die Maltase optimal wirkt bei einem ph von 6,8, während die größte Wirksamkeit der Invertase bei einem ph von 4,5 liegt. Die Meßmethode wurde von Eugen Bamann ausgearbeitet.

Die Befreiung der Carboxylase von der Maltase gelang sehr viel leichter als die von der Invertase. Es war eigentlich keine wirkliche Abtrennung, sondern besser gesagt ein Kontrollversuch, da schon der Rohsaft keine Maltasewirkung mehr zeigte. Dies war auch bei der Unbeständigkeit der Maltase und der Herstellungsweise des Ausgangssaftes anzunehmen, schreibt doch Bamann[1]) schon, daß die Maltase, bei 30° hergestellt, stets innerhalb eines Tages vollständig zugrundegeht. Zur Messung wurde der bereits beschriebene mit Methanol gefällte Rohsaft verwendet.

3. Prüfung auf Proteasen.

Nach Willstätter und Graßmann sind die eiweißspaltenden Fermente der Hefe die Protease, die Dipeptidase und Polypeptidase. Die Protease ist das Enzym, das auf natürliche Proteine wirkt. Seine optimale Wirksamkeit liegt bei ph 5—6, und es steht den pflanzlichen Tryptasen, nicht aber dem tierischen Trypsin nahe. Die Dipeptidase dagegen ist wirkungslos gegenüber allen natürlichen Proteinen, ihr Angriff erstreckt sich auf Dipeptide. Die Polypeptidase schließlich spaltet weder natürliche Proteine noch Dipeptide, sondern ausschließlich synthetische Polipeptide vom Tripeptid an aufwärts. Da die Dipepdidase durch hohe Unbeständigkeit ausgezeichnet ist, erschien es unnötig, darauf zu prüfen. Es kamen vielmehr nur die Protease und die Polypeptidase dafür in Frage. Diese seien hier, wie auch Willstätter und Graßmann das tun, unter dem Namen Hefetrypsin zusammengefaßt. Es ist dann darunter der durch seine Wirkung auf Proteine gekennzeichnete, aber auch gegenüber höheren Peptinen wirksame Enzymbestandteil verstanden[2]).

Die Bestimmung des Hefetrypsins erfolgte durch die von Willstätter und Graßmann ausgearbeitete Titrationsmethode, die in einer Messung der durch das Enzym bewirkten Hydrolyse durch Titrieren mit KOH in alkoholischer Lösung bestand. Es wurde nun zunächst der ganz rohe Mazerationssaft auf Hefetrypsin untersucht. Es zeigte sich, daß schon in diesem keine großen Mengen an Hefetrypsin vorhanden waren. Eine Befreiung gelang schon in der ersten Stufe des bisher angewandten Reinigungsweges. Der mit Methanol gefällte und von einem großen Teil des Eiweiß' abzentrifugierte Saft wies nur noch zu vernachlässigende Spuren an Hefetrypsin auf. Dies

---

[1]) Bamann, Maltase, in Oppenheimer und Pincussen, Methodik der Fermente, S. 856.

[2]) Graßmann, Protease der Hefe, in Oppenheimer und Pincussen, Methodik der Fermente, S. 1007.

ist ohne weiteres mit der starken Affinität der Protease und der Polypeptidase zum Eiweiß zu erklären.

4. Allgemeine Reinigung der Carboxylase.

Damit war die Abtrennung einiger wichtiger Begleitfermente der Carboxylase erreicht, und man erstrebte nun nur noch eine immer stärker werdende Herabsetzung des Trockengewichtes bei gleichbleibender Fermentwirkung. Da ja dies mit der — eben beschriebenen — Reinigung Hand in Hand geht, benutzte man auch zunächst dieselbe Reinigungsmethoden.

Der rohe Mazerationssaft wurde mit Essigsäure und Methanol versetzt und dadurch schon von einem großen Teil der Eiweißstoffe befreit. Eine Verminderung der Carboxylasewirkung trat dadurch nicht ein. Im Gegenteil; bei einer Versuchsreihe konnte sogar nach der Fällung mit Methanol — wobei die Verdünnung natürlich in Rechnung gezogen wurde — eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Auch nach längerem Stehen bei — 15° blieb die Aktivität genau konstant. Methanol erwies sich also als Zusatzmittel in jeder Beziehung als geeignet. — Der Saft wurde nun mit Tannin adsorbiert. Eine in den ersten Versuchsreihen vor der Tanninfällung vorgenommene Kaolinadsorption unterblieb später. Um die geeigneten Versuchsbedingungen für die Tanninfällung zu finden, waren eine große Anzahl Versuche nötig. Es mußte zunächst genau die Menge Tanninlösung ermittelt werden, die gerade die noch im Saft vorhandenen Troteine zur Ausfällung brachte.

Dann zeigte es sich, daß die Carboxylase sich bei der Tanninfälligkeit außerordentlich verschieden verhielt. Es gelang zuweilen nicht, das Ferment aktiv in Lösung zu halten. Die Art der Zugabe des Fällungsmittels war dabei nicht unwesentlich. Wahrscheinlich spielt der Verteilungszustand des kolloidalen Trägers hier eine ausschlaggebende Rolle. Der Ueberschuß an Tannin wurde nun aus dem sich durch eine wesentlich hellere Farbe auszeichnenden Saft mit Hautpulver entfernt. Dieses Reagens erwies sich hierfür sehr geeignet, da es bei Aufnahme sämtlichen Tannins keinerlei Ferment adsorbierte. Dann folgte eine Behandlung des so gereinigten Saftes mit Tonerde. Der Unterschied zu den vorhergegangenen Operationen bestand darin, daß es nicht darauf ankam, das Ferment in Lösung zu behalten, sondern ganz an das Adsorbat zu heften, um es von diesem möglichst ohne die unerwünschten Begleitstoffe wieder loszulösen. Selbstverständlich waren auch hier größere Versuchsreihen nötig, um die günstigsten Bedingungen, wie Menge der Tonerde, Dauer der Adsorption usw., zu ermitteln. Das einmal erhaltene Adsorbat zeigte sich sehr beständig, wenn man es in der Kälte aufbewahrte. Die nun angeschlossene Elution bildete den Schluß des

Reinigungsganges. Eluiert wurde mit primärem Phosphat, und zwar in der Kälte etwa 4 bis 5 Stunden. Das Eluat zeigte volle Aktivität und war in der Kälte verhältnismäßig beständig, während es schon bei Zimmertemperatur außerordentlich schnell seine Aktivität verlor. Zur Bestimmung des Trockengewichtes unterzog man den eluierten Saft nun noch einer Dialyse. Das beste Carboxylasepräparat hatte nach der Dialyse nur noch ein Tausendstel vom Trockengewicht des Rohsaftes, auf die gleiche Aktivität bezogen. Das Trockengewicht wurde vor dem Dialysieren gemessen, da die Aktivität während der bei Zimmertemperatur vorgenommenen Dialyse zugrunde ging. Dann erfolgte eine Prüfung der Eluate auf Invertase, Maltase und Proteasen, und es konnte festgestellt werden, daß keines dieser Fermente mehr im Saft vorhanden war. Damit fand die Arbeit auf diesem Gebiet ihren Abschluß. Ein Teil der Versuche der Aktivitätssteigerung der Carboxylase wurde in gemeinsamer Arbeit mit Herrn Wrede durchgeführt.

Im zweiten Teil wird die Reinigung der Invertase behandelt. Die Anregung dazu erfolgte durch die Abtrennungsversuche der Invertase von der Carboxylase.

b) Versuchsteil.

1. Abtrennung von Invertase.

Meßmethode für Invertasewirkung:

Die Aktivität der Invertase in den Säften wurde polarimetrisch gemessen, und zwar mittels der Willstätterschen Vergleichszeitmethode[1]), die nachstehend beschrieben werden soll: Als Substrat zur Bestimmung der Invertase dient Rohrzucker von einer spezifischen Drehung = 66,86 °. Von dem im Handel käuflichen Zucker kommt dieser Forderung nur der weiße kleinkristalline Kandiszucker nach, der auch bei den Messungen dieser Arbeit verwendet wurde. — In einen Thermostaten von 30 ° wird ein Kolben von 100 ccm Inhalt gehängt und in diesen 5 ccm einer primären Kaliumphosphatlösung und 50 ccm einer 9,5prozentigen Rohrzuckerlösung hineinpipettiert. Im gleichen Thermostaten befindet sich eine Spritzflasche mit Wasser und ein Kölbchen mit der Fermentlösung. Nachdem nach etwa 10 Minuten die Temperatur angenommen ist, wird die Enzymlösung unter Anmerkung der halben Auslaufszeit der Pipette einlaufen lassen. Die Menge derselben wird so gewählt, daß die halbe Spaltung in 10 bis 40 Minuten erreicht ist. Den Gang der Zuckerhydrolyse verfolgt man durch Entnahme von Proben, die zwecks Sistierung der

[1]) Nach Willstätter und Steibelt, Bestimmung der Maltase in der Hefe, Zs. Phys. Chem. 111, 157, 169 (1920).

Sacharasewirkung und Aufhebung der Mutarotation in 2n-Sodalösung eingetragen werden. Die abgestoppten Proben müssen spätestens zwei Stunden nach der Entnahme polarisiert sein, da sich sonst die Zerstörung der Hexosen durch Alkali bemerkbar machen. Da die Drehung der Fruktose stark temperaturabhängig ist, muß auf genaue Konstanz des Thermostaten geachtet werden. Zwei entnommene Proben erlauben mit ziemlicher Genauigkeit die Halbspaltungszeit, d. i. die Zeit, bei welcher 50 % des Substrates hydrolisiert sind, zu bestimmen. Nach dem gefundenen Polarisationswinkel d berechnet sich dann die Halbspaltungszeit tv nach folgender Formel:

$$tv = \frac{\tau}{T} \cdot 7{,}10$$

in der die Zeit vom Beginn der Inversion bis zur Stoppung und T der Zeitfaktor für den im Augenblick der Stoppung erreichten Spaltungsgrad ist. Letzterer wird der von Willstätter experimentell gefundenen Zeitumsatzkurve entnommen. Er beträgt für 50prozentige Spaltung 7,10. Als Vergleichszeitwert ergibt sich dann:

Vergleichszeitwert $= \frac{tv \cdot g}{500}$, wobei g die zur Spaltung von 25 ccm Bestimmungslösung angewandte Enzymtrockensubstanz in Milligrammen ist. Obwohl diese Bestimmungsmethode allgemein zur Anwendung kommt, so werden, da der Vergleichszeitwert eine ganz kleine Größe darstellt, die Bezeichnungsweisen für Reinheitsgrad und Enzymmenge durch Zeitwert und M. Z. Q. bzw. durch S. W. und S. E. ausgedrückt. (R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel, XII. Abh. „Zur Kenntnis der Inv. Zs. phys. Chem.", 151, 1.) Der Zeitwert beträgt das 166fache des Vergleichszeitwertes und berechnet sich zu:

$tv \cdot g \cdot 0{,}332$, der Sacharasewert also zu:

$$S.\text{-}W. = \frac{1}{tv \cdot g \cdot 0{,}332}$$

In der vorliegenden Arbeit wird mit den Größen Sacharasewert, Sacharaseeinheit und Halbspaltungszeit gerechnet.

Herstellung des Rohsaftes.

Als Ausgangsmaterial diente, wie schon erwähnt, untergärige Brauereihefe, die die Germania-Brauerei, Münster, und die Löwenbräu-Brauerei, München, liebenswürdigerweise zur Verfügung stellten. Wegen des etwas verschiedenen Verhaltens der beiden Heferassen soll bei den aufgeführten Versuchen immer hinzugesetzt werden, welche Hefe zur Herstellung des Saftes diente. Um den Rohsaft darzustellen, wandelte man zunächst die frische Hefe, indem man sie durch ein 5-mm-Sieb preßte und sechs Tage bei Zimmer-

temperatur trocknete, in Trockenhefe um. Dann wurde ein Teil Trockenhefe mit drei Teilen Wasser fein verrieben, drei Stunden in Paraffinölthermostaten bei 30° behandelt und zentrifugiert. Der überstehende Saft wurde sofort eingefroren, der Niederschlag wieder mit der Anfangsmenge Wasser verrieben, zentrifugiert und zu dem ersten eingefrorenen Teil hinzugegossen.

Herstellung von kaolinadsorbiertem Saft.

10 ccm Rohsaft wurden mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt, mit 5 ccm 0,1225 n-Essigsäure versetzt und an 5 g Kaolin adsorbiert. Daran schloß sich eine Messung des Saftes auf Invertasegehalt an.

Versuch 10[1]).

Messung des kaolinadsorbierten wässrigen Rohsaftes.

Es soll bei diesem Versuch als Beispiel eine Messung mit allen Einzelheiten gezeigt werden, während in allen folgenden nur die maßgeblichen Daten aufgeführt werden.

5 ccm kaolinadsorbierten Saftes wurden zu 50 ccm Zuckerlösung und 5 ccm Pufferlösung zulaufen gelassen, auf 100 ccm aufgefüllt und zur Hydrolyse in einen Thermostaten von 30° gehängt. Nach 20 Minuten erfolgte die erste Stoppung, bei der 25 ccm entnommen und in 5 ccm einer bereitstehenden ln-Sodalösung einpipettiert wurden. Die nach weiteren zehn Minuten vorgenommene zweite Stoppung geschah in derselben Weise. Die anschließende Polarisation der beiden Proben ergab:

1. Probe (nach 20 Minuten)

1. 3,05 Grad
2. 3,03 „
3. 3,07 „
4. 3,03 „
5. 3,08 „
6. 3,04 „
7. 3,09 „
8. 3,01 „

24,40 : 8 = 3,05.

Der Nullpunkt des Polarimeters betrug 0,08, folglich ergab sich als Drehung:

3,05
— 0,08
d = 2,97

[1]) Die Versuche sind mit denselben Nummern bezeichnet, wie sie während der Anfertigung der Arbeit numeriert wurden.

Der dazugehörige aus der Willstätterschen Tabelle entnommene Zeitfaktor war T = 4,39, und die Halbspaltungszeit errechnete sich danach zu:

$$tv = \frac{\tau \cdot 7{,}10}{T}, \quad tv = \frac{20 \cdot 7{,}10}{4{,}39} = \mathbf{32{,}4}$$

2. Probe (nach 30 Minuten)

1. 1,95 Grad
2. 1,90 „
3. 1,94 „
4. 1,97 „
5. 1,97 „
6. 1,92 „
7. 1,91 „
8. 1,92 „

15,48 : 8 = 1,93

1,93
— 0,08
d = 1,85

T = 6,96
(siehe Tabelle)

$$tv = \frac{\tau \cdot 7{,}10}{T} = \frac{30 \cdot 7{,}10}{6{,}96} = \mathbf{31}$$

Die Halbspaltungszeit betrug also nach den beiden Stoppungen 32,4 und 31, als Mittel ergab sich daraus **tv = 31,7.**

Umgerechnet auf Sacharaseeinheiten und Sacharasewert:

$$S.\text{-}E. = \frac{1}{tv} = \frac{1}{31{,}7} = 0{,}0315$$

S.-E. = 0,0315 in 5 ccm Saft.

$$S.\text{-}W. = \frac{1}{tv \cdot mg \cdot 0{,}332}$$

$$S.\text{-}W. = \frac{1}{31{,}7 \cdot 55{,}1 \cdot 0{,}332} = 0{,}0016$$

S.W. = 0,0016.

Das Trockengewicht 55,1 mg in 5 ccm Saft wurde durch Eindampfen von 20 ccm in der Platinschale ermittelt.

Bei den folgenden Abtrennungsversuchen der Invertase von der Carboxylase ist, wie schon erwähnt, der obige kaolinadsorbierte Saft als Ausgangssaft angenommen worden und seine Sacharaseeinheiten = 100 % gesetzt. Die Sacharaseeinheiten natürlich in der-

selben ccm-Zahl der anderen adsorbierten Säfte wurden damit verglichen und danach ihr Prozentgehalt an Invertase berechnet.

Versuch 12.

Tonerdeadsorption des kaolinadsorbierten Saftes mit 2 ccm Tonerde.

Zu 10 ccm kaolinadsorbiertem Saft gab man 1 ccm Tonerde tropfenweise hinzu. Nach ordentlichem Umschütteln wurde abzentrifugiert und der überstehende Saft abgegossen. Die anschließende Messung und Polarisation ergab eine Halbspaltungszeit tv = 32; das sind in 5 ccm 0,0313 Sacharaseeinheiten oder 99,36 % Invertase auf den kaolinadsorbierten Ausgangssaft bezogen.

Versuch 13.

Tonerdeadsportion des kaolinadsorbierten Saftes mit 2 ccm Tonerde.

Die Adsorption wurde entsprechend Versuch 12 vorgenommen. Die Halbspaltungszeit betrug tv = 43, das sind in 5 ccm 0,0233 Sacharaseeinheiten oder 73,97 % Invertase.

Versuch 14.

Tonerdeadsorption des kaolinadsorbierten Saftes mit 4 ccm Tonerde.

Die Halbspaltungszeit tv war in diesem Falle = 46, das sind 0,0217 Sacharaseeinheiten in 5 ccm oder 68,9 % Invertase.

Das ph betrug bei sämtlichen vier Versuchen elektrolytisch gemessen 4,86.

Im folgenden sind die eben beschriebenen Daten kurz in einer Tabelle zusammengefaßt und die sich daraus ergebende Kurve mit der Carboxylasekurve verglichen [1]).

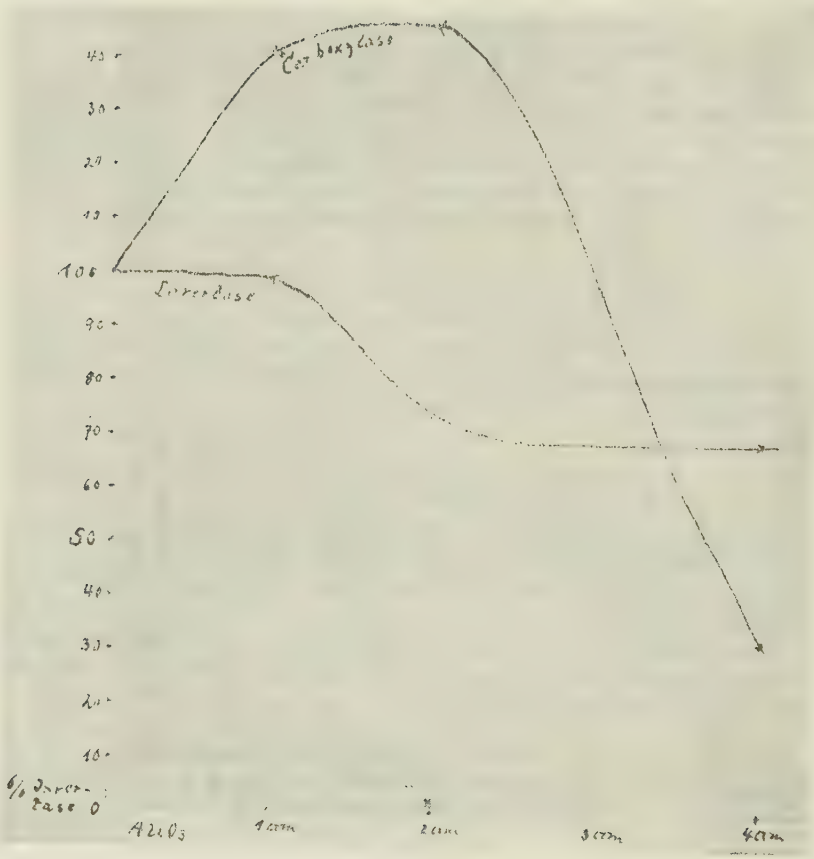
I.

Tabelle für den Verlauf der Adsorptions-Kurven von Carboxylase und Invertase.

ph = 4,86	Halbspaltungs-zeit tv	Sacharase-Einheiten in 5 ccm	Prozente an Invertase
1. Kaolinads. Saft	31,7	0,0315	100 %
2. Mit 1 ccm Al_2O_3 ads.	32	0,0313	99,4 %
3. Mit 2 ccm Al_2O_3 ads.	43	0,0233	73,9 %
4. Mit 4 ccm Al_2O_3 ads.	46	0,0217	68,8 %

[1]) Die Carboxylasekurve wurde von Herrn Wrede aufgestellt.

Kurve 1.



Aus der Kurve ist deutlich ersichtlich, daß eine Trennung von Carboxylase und Invertase auf diesem Wege nicht möglich ist.

Herstellung von Rohsaft mit Methanol.

Die Herstellungsweise unterscheidet sich nur dadurch von der des wässrigen Saftes, daß das Volumen des fertigen zusammengegossenen konzentrierten und verdünnten Rohsaftes gemessen und mit dem halben Volumen absoluten Methanols versetzt wurde. Dann

gab man auf 10 ccm methanolischen Saft 2 ccm 0,3 mol. Essigsäure hinzu und zentrifugierte das ausgefällte Eiweiß ab. Der fertige Saft wurde bei — 20° aufbewahrt.

Versuch 25.

Messung des kaolinadsorbierten methanolischen Rohsaftes.

Nachdem der methanolische Rohsaft in derselben Weise wie der wässrige mit Kaolin adsorbiert war, wurde der Invertasegehalt gemessen. Es ergab sich bei Anwendung von 5 ccm zur Messung eine Halbspaltungszeit von 26. Die des wässrigen hatte 31,7 betragen. Es sind also mit der Ausfällung des Eiweiß durch Methanol Hemmungskörper beseitigt worden, wodurch sich die Invertaseaktivität erhöhte. Die nun folgenden Versuche beschäftigen sich wieder mit der gleichen Tonerdeadsorption, nur das jetzt der methanolische Saft adsorbiert wurde. Seinen Invertasegehalt setzte man jetzt auch gleich 100 % und bezog den der adsorbierten Säfte hierauf.

Versuch 26.

Tonerdeadsorption des kaolinadsorbierten methanolischen Saftes mit 2 ccm Al_2O_3.

10 ccm des methanolischen kaolinadsorbierten Saftes wurden in der bekannten Weise mit 2 ccm Tonerde adsorbiert und die Invertasewirkung des überstehenden Saftes gemessen. Die Halbspaltungszeit tv betrug 36, das sind 0,0277 S.-E. (in 5 ccm) oder 72 % Invertase.

Versuch 27.

Tonerdeadsorption des kaolinadsorbierten methanolischen Saftes mit 4 ccm Al_2O_3.

Die Messung ergab eine Halbspaltungszeit von 44, das sind 0,0227 S.-E. oder 59,1 % Invertase.

Es besteht also kein großer Unterschied im Adsorptionsverlauf des wässrigen kaolinabsorbierten Saftes und des methanolischen kaolinadsorbierten Saftes.

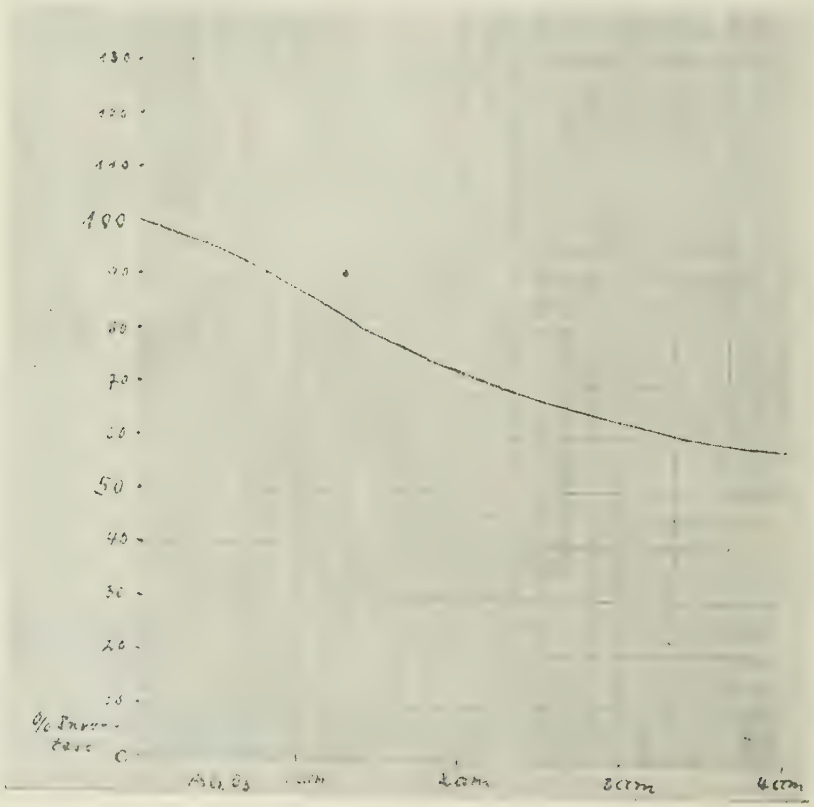
Die im folgenden kurz die Daten zusammenfassende Tabelle und der Kurvenverlauf zeigen wieder deutlich, daß auf diesem Wege die Invertase nicht aus dem Saft entfernt werden konnte.

II.

Tabelle für den Adsorptionsverlauf der Invertase in methanolischer Lng.

	Halbspaltungs-zeit tv	Sacharase-Einheiten in 5 ccm	Prozente an Invertase
1. Kaolinads. meth. Saft	26	0,0384	100 %
2. Methan. kaolinads. Saft mit 2 ccm Al_2O_3	36	0,0277	72 %
3. Methan. kaolinads. Saft mit 4 ccm Al_2O_3	44	0,0227	59 %

Kurve 2.



Versuch 38.

Tanninadsorption des methanolischen kaolinadsorbierten Saftes mit 0,5 ccm auf 10.

Als Adsorptionsmittel diente eine 5prozentige Tanninlösung in 30prozentigem Methanol. 0,5 ccm ließ man in 10 ccm Saft unter langsamem Umschwenken eintropfen und zentrifugierte ab. In der Lösung wurde das tv zu 30,5 gemessen.

Versuch 39.

Tanninadsorption des methanolischen kaolinadsorbierten Saftes mit 1 ccm auf 10.

Nach dem Zentrifugieren zeigte die Lösung ein tv von 64,4. Die starke Abnahme des Invertasegehaltes ließ vermuten, daß bei Anwendung größerer Mengen des Adsorptionsmittels eine vollständige Entfernung der Invertase aus der Lösung möglich ist.

Versuch 40.

Tanninadsorption des methanolischen kaolinadsorbierten Saftes mit 2 ccm auf 10.

Die Messung ergab eine Halbspaltungszeit tv = 110. Als sehr lästig erwies sich in diesem Falle die durch die verhältnismäßig große Tanninmenge bedingte starke Gelbfärbung, die die Polarisation sehr erschwerte. Es mußte die gestoppte neutralisierte Lösung mehrmals mit Tierkohle behandelt werden, bevor sie gemessen werden konnte.

Weitere Tanninadsorptionen mit noch größeren Mengen des Adsorptionsmittels wurden nicht vorgenommen, einmal aus dem schon erwähnten Grunde der durch die starke Färbung zu sehr erschwerten Polarisation und zweitens, weil die parallel laufenden Carboxylasemessungen zeigten, daß die Carboxylase schon bei 0,8 auf 10 restlos adsorbiert wurde, also eine Trennung auf diesem Wege unmöglich ist. In Figur 3 ist der Adsorptionsverlauf der Tanninlösung dargestellt. Auf der Abskizze sind die Tanninmengen in ccm angegeben, auf der Ordinate die Aktivitäten der Lösungen bei Zusatz verschiedener Tanninmengen aufgetragen, ausgedrückt in Prozenten der Aktivität ohne Tanninzusatz.

Interessant ist das Verhalten der Carboxylase [1]), die zuerst bei 0,4 ccm Tanninlösung auf 177 % ansteigt, um dann ganz steil abzufallen. Durch die Ausfällung des Eiweiß wird offenbar wieder eine Hemmung beseitigt. Die tanninadsorbierten Lösungen wurden auf Eiweiß geprüft, sie gaben mit Sulfosalizylsäure keine Trübungen mehr.

---

[1]) Die Kurve wurde von H. Wrede aufgestellt.

Sämtliche bisher beschriebenen Versuche wurden mit Saft aus Münsterscher Germania-Brauerei-Hefe vorgenommen.

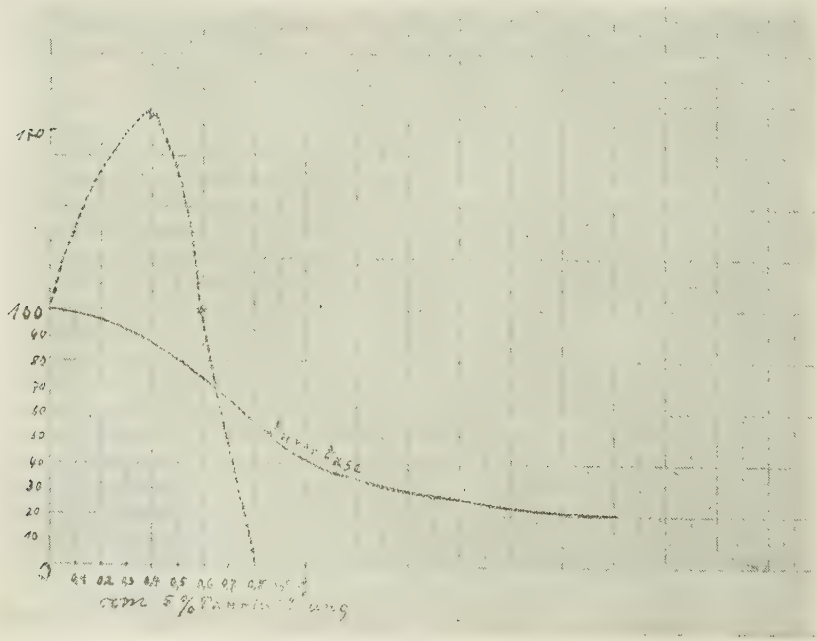
Bei den nächstfolgenden Versuchen diente Hefe der Löwenbrauerei, München, als Ausgangsmaterial.

III.

Tabelle für den Verlauf der Tanninadsorption von Carboxylase und Invertase.

	Halbspaltungszeit tv	Sacharase-Einheiten in 3 ccm	Prozente an Invertase
1. Kaolinads. meth. Saft	26	0,0385	100 %
2. Mit 0,5 ccm Tannin adsorbiert	30,5	0,0328	85 %
3. Mit 1 ccm Tanninlösung adsorbiert	64,4	0,0156	40,3 %
4. Mit 2 ccm Tanninlösung adsorbiert	110	0,0091	23,6 =

Kurve 3.



Versuch 45.

Trennung von Invertase und Carboxylase durch mehrere aufeinanderfolgende Adsorptionen.

a) Herstellung von methanolischem kaolinadsorbiertem Saft.

Die Herstellung erfolgte in der bereits bekannten Weise. Auf 5 ccm Mazerationssaft, die auf 50 ccm aufgefüllt und mit 5 ccm 0,12 mol. Essigsäure versetzt waren, kamen 5 Gramm Kaolin. Nach kurzem Umrühren und Zentrifugieren wurde die überstehende Lösung mit dem halben Volumen Methanol gemischt und vom ausgeschiedenen Eiweiß wieder abzentrifugiert. Diesen Saft benutzte man für den weiteren Trennungsgang. Seine Messung auf Invertase ergab eine Halbspaltungszeit tv = 72, das sind 0,0138 S.-E. in 3 ccm (die zur Messung verwendet wurden).

b) Tanninfällung des kaolinadsorbierten methanolischen Saftes.

10 ccm Saft versetzte man mit 0,4 ccm 5prozentiger Tanninlösung (Tannin in 30prozentigem Methanol), und zwar in der Weise, daß man den Saft in gekühltem Zustande in gleichmäßigem Strahl in die in einem Zentrifugierröhrchen vorgelegte Tanninlösung einfließen ließ. Nach kurzem Stehen wurde abzentrifugiert und das überschüssige Tannin mit Hautpulver entfernt. Dies geschah so, daß man die Lösung bei — 20° mit 0,199 Hautpulver auf 10 Saft (pro analysi, Merck) behandelte. Nach dem Absaugen durch eine große Glasfilternutsche ergab die Prüfung mit Eisenchlorid ein tanninfreies Filtrat. Die Halbspaltungszeit dieser Lösung war 84, das sind 0,0119 S.-E. in 3 ccm oder ein Prozentgehalt an Invertase verglichen mit dem kaolinadsorbierten Ausgangssaft von 87,7 %. Die Abnahme an Invertin war also bisher gering und entsprach etwa den schon früher vorgenommenen Tanninadsorptionen. Als nächstes schloß sich nun die Tonerdeadsorption an.

c) Tonerdeadsorption des Tannin-Hautpulver adsorbierten Saftes.

10 ccm Lösung versetzte man mit 2,5 ccm einer Aufschlämmung von gealterter Tonerde B in 30prozentigem Methanol (13,6 mg Al_2O_3 pro Kubikzentimeter). Nach einer Stunde wurde abzentrifugiert, dreimal mit je 5 ccm verdünntem Methanol gewaschen und schließlich wieder mit 5 ccm Methanol aufgerührt. Die Suspension zeigte bei der Messung auf Carboxylase starke Aktivität. Auf Invertase wurde erst nach der angeschlossenen Elution geprüft.

d) Elution mit primärem Kaliumphosphat.

10 ccm Tonerdesuspension eluierte man drei Stunden mit 60 ccm primärem Kaliumphosphat (2 Vol. 0,1 mol. KH_2PO_4 plus 1 Vol. Methanol) bei — 20°. Nach dem Zentrifugieren zeigte das Eluat Carboxylaseaktivität, während die Messung auf Invertase keine Drehung mehr ergab. Das Ganze in Prozenten ausgedrückt ergab folgendes Bild:

1. Kaolin adsorbierten Saft	Carboxylase =	100 %
	Invertase =	100 %
2. Tannin-Hautpulver adsorbierter Saft . .	Carboxylase =	175 %
	Invertase =	88 %
3. Eluat	Carboxylase =	252 %
	Invertase =	0 %

2. Prüfung auf Maltase.

Meßmethode: Bei der Maltasenmessung fand wieder die Willstättersche Polarisationsmethode Anwendung, die hier nicht näher beschrieben werden braucht, da sie der der Invertasemessung genau gleicht. Die einzige Abweichung bestand darin, daß Maltose als Substrat verwendet wurde und daß eine Pufferlösung von molargleichen Mengen $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ und KH_2PO_4 zur Anwendung kam. (ph = 6,8.)

Versuch 47.

Prüfung des Rohsaftes auf Maltase.

Gemessen wurde der bereits beschriebene Rohsaft, der mit Methanol und Essigsäure versetzt und dadurch schon von einem großen Teil der Eiweißstoffe befreit war. Die Polarisation, die genau wie die der Invertase nach Entnahme von 25 ccm und Neutralisation in 5 ccm ln-Sodalösung im 2 dcm Rohr vor sich ging, zeigte bei zwei verschiedenen Messungen nachstehende Drehungswinkel:

1. Anfangsdrehung der Versuchslösung	d = 10,77
Enddrehung (die gleiche nach 20, 60 und 120 Minuten)	d = 10,74
2. Anfangsdrehung der Versuchslösung	d = 10,74
Enddrehung (gleichbleibend nach 20, 60 und 120 Minuten)	d = 10,73

das heißt also, daß keine Maltasewirkung mehr festzustellen war.

3. Prüfung auf Proteasen.

Meßmethode: Für die Messung des Hefetrypsins benutzte man die von W. Graßmann dargelegte Titrationsmethode, die er ungefähr folgendermaßen beschreibt[1]): Zu einer Lösung von 1,5 g isoelek-

[1]) Graßmann, a. a. O. S. 1010.

trischer Gelatine und 4 ccm m/5 Dinatriumzitrat (Sörensen), die in einem 25-ccm-Meßkolben auf 40° vorgewärmt sind, werden 3 bis 5 ccm Saft zugegeben, zur Marke aufgefüllt und nach Zugabe von zwei Tropfen Toluol und gutem Umschütteln eine Probe von 10 ccm zur Titration entnommen. Nach 24 Stunden entnimmt man aus der bei 24° gehaltenen Mischung weitere 10 ccm. Durch die Differenz der beiden Titrationen ergibt sich die Hydrolyse. Zur Ausführung der Titration benötigt man 1. eine 0,2n-Lösung von KOH in 90-prozentigem Alkohol und 2. eine 0,5prozentige alkoholische Lösung von Thymolphtalein. Unter Zugabe von zehn Tropfen Thymolphtalein titriert man die dem Thermostaten entnommenen 10 ccm auf kräftige Blaufärbung, fügt dann solange Alkohol hinzu, daß Entfärbung, aber noch keine Ausfällung des Proteins eintritt. Danach wird wieder auf Blau titriert usw., bis die Lösung auch bei deutlicher Blaufärbung des Indikators getrübt bleibt. Von diesem Zeitpunkt an wird der Rest des Alkohols (neunfache Menge des Substrates) hinzugegeben und sofort titriert, bis eine deutliche Blaufärbung stehen bleibt. Auf diese Weise ist es leicht möglich, beträchtliche Mengen Alkohol und den größten Teil der erforderlichen KOH hinzuzufügen, ehe eine bleibende Ausfällung des Substrates erfolgt. Nachdem der letzte Alkohol zugesetzt ist, verbleibt eine milchige Suspension, die nur noch wenige Zehntel bis zur Erreichung des Farbumschlages erfordert. Der Alkohol wird vor der Zugabe heiß gemacht.

Herstellung des Dinatriumzitratpuffers.

10,5 g Zitronensäure wurden mit 50 ccm karbonatfreier In-Natronlauge gelöst und mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt.

Versuch 50.

Prüfung des rohen Mazerationssaftes auf Proteasen.

3 ccm des rohen aus Münchener Löwenbräu-Hefe hergestellten Mazerationssaftes, der noch nicht mit Methanol und Essigsäure versetzt war, dienten zur Messung. Wie die nachstehenden Daten zeigen, war schon in diesem Saft die Wirkung des Hefetrypsins sehr schwach.

Verbrauchte KOH zu Beginn . . . . . 8,00 ccm
Verbrauchte KOH nach 24 Stunden . . . 8,75 ccm

bei Verwendung von 3 ccm Fermentlösung.

Versuch 53.

Prüfung des Methanol und Essigsäure gefällten Rohsaftes auf Proteasen.

Zur Messung wurden 3 ccm des mit Methanol und Essigsäure versetzten und vom Eiweiß abzentrifugierten Mazerationssaftes aus

Münchener Löwenbräu-Hefe benutzt. Praktisch war keine Hefetrypsinwirkung mehr festzustellen:

Verbrauchte KOH zu Beginn	8,03
Verbrauchte KOH nach 24 Stunden	8,25

bei Verwendung von 3 ccm Fermentlösung.

4. Allgemeine Reinigung der Carboxylase.

Meßmethode: Die Messung der durch die Carboxylasewirkung abgeschiedenen CO_2-Mengen aus Brenztraubensäure erfolgte in den Manometern einer Barcroft-Warburg-Apparatur. Da das Aciditätsoptimum von H. v. Euler und S. Karlsson zwischen ph 4,5 und 5,5, von E. Häggl und T. Rosenquist zwischen ph 3,5 und 6 gefunden ist, wurde bei den vorliegenden Messungen ein Azetatpuffer 0,3 mol. 1 : 1, d. i. ph 4,7 verwendet. In diesem wurde brenztraubensaures Natrium gelöst. Herstellung des Salzes siehe W. Langenbeck, R. Jüttemann, O. Schaefer und H. Wrede „Ueber Carboxylase", Zeitschrift für Physiologische Chemie, Band 221. Die Substratlösung stellte man folgendermaßen her: In 20 ccm 0,3 mol. Azetatpuffer 1 : 1 wurden 40 mg brenztraubensaures Natrium eingewogen. Diese Lösung mußte wegen der sich leicht zersetzenden Brenztraubensäure jeden Tag frisch angesetzt werden. In jeden Atmungstrog kamen dann zur Messung 0,2 ccm Fermentlösung und 1,75 ccm Puffer-Substratmischung. Von diesen waren in den späteren Versuchen 0,5 ccm durch Kochsaft ersetzt. Die Bedeutung des Kochsaftes wird in der Dissertation von H. Wrede, Münster, eingehend auseinandergesetzt. Bei der Durchführung der Messung in der Warburg-Schüttelapparatur bei 20° folgte alle fünf Minuten eine Ablesung des Manometerstandes, nachdem zu Beginn fünf Minuten zum Temperaturausgleich nicht abgelesen war. Die gemessenen CO_2-Mengen bieten nun die Grundlage für die Definition folgender Enzymeinheiten, die bei den Ausführungen in Zukunft gebraucht werden sollen.

Unter Carboxylaseeinheit C.-E. versteht man diejenige Fermentmenge, die bei der angegebenen Substratkonzentration und Acidität in einer Minute 1 ccm Kohlendioxyd in Freiheit setzt.

Der Carboxylasewert C.-W. ist die Zahl der Carboxylaseeinheiten in 1 mg Trockengewicht.

Die Aktivität der Fermentlösungen wird durch Carboxylaseeinheiten pro ccm (C.-E./ccm) ausgedrückt.

Reinigungsversuche.

Von den in außerordentlich großer Anzahl ausgeführten Adsorptionsversuchen mit Kaolin, Tonerde und Tannin seien hier nur einige wenige wiedergegeben, die einen wirklichen Fortschritt im

Reinigungsgang zeigen. Es soll wieder der erste Versuch als Beispiel mit allen Messungseinzelheiten aufgeführt werden.

Versuch 54.

Reinigungsgang bestehend aus:

a) Fällung des Rohsaftes mit Methanol und Essigsäure,
b) Tanninfällung,
c) Hautpulveradsorption,
d) Tonerdeadsorption,
e) Elution.

a) Messung des mit Methanol und Essigsäure gefällten Rohsaftes.

Die Herstellung ist bereits aus dem Vorhergehenden bekannt. Zur Messung werden, wie in „Meßmethode" erläutert, 0,25 ccm Saft verwendet.

IV. Tabelle.

Zeit	Leergefäß	Gefäß 4, Rohsaft
19^{30}	13,75	10,1
19^{35}	13,9	11,35
19^{40}	13,9	12,09
19^{45}	13,88	12,25
19^{50}	13,9	12,5
Gefäßkonstanten		1,3146
Milliccm in 20 Min. $= 22{,}5 \cdot 1{,}3146 = 29{,}6$ Milliccm in den ersten 5 Min. $= 1{,}1 \cdot 1{,}3146 = 14{,}46$		

Das sind in C.-E./ccm ausgedrückt:

0,25 ccm in 5 Min. . . . . 14,46 mccm CO_2
0,25 ccm in 1 Min. . . . . 2,892 mccm CO_2
1 ccm in 1 Min. . . . . $2{,}892 \cdot 4 = 11{,}57$.

C.-E./ccm = 11,57.

b) Messung des tanninadsorbierten Saftes.

Die angeschlossene Tanninadsorption mit 0,4 ccm Tanninlösung auf 10 ccm Saft erfolgte in derselben Weise, wie sie bereits bei der Abtrennung der Invertase beschrieben wurde. Die Messung ergab

14,66 C.-E./ccm.

c) Messung des Hautpulver adsorbierten Saftes.

Nach der Entfernung des überschüssigen Tannins mit Hautpulver behielt der Saft ungefähr die gleiche Aktivität. Die C.-E./ccm betrugen **26.**

d) Messung des mit Tonerde adsorbierten Saftes.

Die mit 2 ccm auf 10 vorgenommene Tonerdeadsorption wurde wieder in der bekannten Weise durchgeführt. Die Aktivität des nach dreimaligem sorgfältigen Waschen gemessenen Adsorbates betrug **27,99 C.-E./ccm.**

e) Messung des eluierten Saftes.

Nach der Elution mit primärem Kaliumphosphat (60 ccm Phosphat auf 10 ccm Saft) bei — 20 ° zeigte das Eluat eine Aktivität von **24,3 C.-E./ccm.**

Zur Umrechnung auf Carboxylaseeinheit bzw. Carboxylasewert C.-W. erfolgte eine Trockengewichtsbestimmung des Eluates, nachdem dieses vorher mehrere Tage im rotierenden Dialysator durch Cellophan dialysiert war.

Das Trockengewicht in einem ccm des dialysierten Eluates betrug 1,74 mg, die Carboxylaseeinheiten pro ccm **24,3.**

Daraus folgt:

$$\text{C.-W.} = \frac{24{,}3}{0{,}174} = \mathbf{139{,}7}$$

Der Carboxylasewert des Rohsaftes war zu 0,35 gefunden, der Wert 139,7 stellt also eine 400fache Reinigung dar.

Versuch 56.

Reinigungsgang bestehend aus:

a) Fällung des Rohsaftes mit Methanol und Essigsäure,
b) Tanninfällung,
c) Hautpulveradsorption,
d) Tonerdeadsorption,
e) Elution.

Der Reinigungsweg war derselbe wie in Versuch 54. Es wurden auch bei allen Adsorptionen dieselben Mengen verwendet. Der Unterschied in den Werten ist sowohl damit zu erklären, daß sich jeder Hefesaft wieder anders verhält, wie auch damit, daß im Verlauf des verhältnismäßig langen Reinigungsweges der eine oder andere Handgriff unterschiedlich zu denen der anderen Versuche ausgeführt wurde, was bei enzymatischen Arbeiten oft von größter Bedeutung ist. Da, wie schon gesagt, die Einzelheiten dieses Versuchs dieselben waren wie bei den vorigen, sollen im Kommenden

nur die Messungsergebnisse der einzelnen Reinigungsstufen wiedergegeben werden.

a) Messung des mit Methanol und Essigsäure gefällten Rohsaftes.
Die Messung ergab **33,3 C.-E.**/ccm.

b) Messung des mit Tannin gefällten Saftes.
Die Aktivität betrug **35 C.-E.**/ccm.

c) Messung des mit Hautpulver adsorb. Saftes.
Die Messung ergab **42,3 C.E.**/ccm.

d) Messung des Tonerdeadsorbates.
Die C.-E./ccm betrugen **76,9.**

e) Messung des Eluates.
Das Eluat hatte eine Aktivität von 18,1 C.-E./ccm.

Nach viertägiger Dialyse ergab die Trockengewichtsbestimmung 0,526 mg in einem ccm. Daraus errechnet sich der C.-E. zu

$$\text{C.-W.} = \frac{18{,}1}{0{,}526} = \mathbf{344}$$

Das bedeutet gegenüber dem anfangs erhaltenen Carboxylasewert des Rohsaftes eine tausendfache Reinigung.

II. Invertase.

a) Theoretischer Teil:

Die Invertase ist wohl das Ferment, mit dem man sich am frühesten und am meisten beschäftigt hat, gehen die ersten Versuche doch schon auf Berthelot, Liebig und Donath zurück. Der Grund ist darin zu sehen, daß die Invertase leicht zugänglich ist und im Gegensatz zu einer großen Anzahl anderer Fermente in ihrer Aktivität eine große Beständigkeit aufweist. Als Ausgangsmaterial diente bei fast allen bisherigen Arbeiten die Hefe, aus der die Invertaselösungen auf die verschiedenste Weise dargestellt wurden. M. Barth[1]) und E. Salkowski[2]) z. B. benutzten die Hefe im getrockneten Zustande; J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper[3]) verwendeten lebende Hefe und stellten daraus Hefepreßsaft her; die neueren und neuesten Methoden benutzten zum Loslösen der Invertase sämtlich die Autolyse, deren Ursprung in

---

[1]) M. Barth, Zur Kenntnis der Invertase, Chem. Ber. 9, 4774 (1876).

[2]) E. Salkowski, Ueber das Invertin der Hefe, Z. Phys. Chem. 31, 305 (1901).

[3]) J. Meisenheimer, Gambarjan und Semper, Reinigung der Inv.-Präp. durch Behandl. mit Säure, Biochem. Z. 54, 108 (1913).

der klassischen Arbeit von C. O. Sullivan und F. W. Tompson[1]) zu suchen ist.

Wesentliche Fortschritte brachten die Arbeiten der Münchener Schule dadurch in die Sacharasechemie, daß sie quantitative Meßmethoden ausarbeiteten, durch die der ganze Reinigungsgang kontrolliert wurde. Eng in Verbindung damit stehen die Erfolge Willstätters, die sich vor allen Dingen auf seine Adsorptionsmethoden gründen. Obgleich auf diese Weise außerordentlich reine Invertasepräparate erhalten wurden, konnte man die Frage, zu welcher Stoffklasse das Ferment gehört, bisher nicht beantworten.

Die eben erwähnten Adsorptionsmethoden sollen auch in der vorliegenden Arbeit benutzt werden, deren Ziel es ist, eine Zusammenstellung zu finden, die einen möglichst einfachen eleganten Reinigungsweg darstellt.

Es wurde nun so vorgegangen, daß man vom Rohsaft bis zum reinsten Präparat den Invertasegehalt feststellte und auf das jeweils im Saft vorhandene Trockengewicht bezog. Zur Messung benutzte man die schon bei der Abtrennung der Invertase von der Carboxylase beschriebene Vergleichszeitwertmethode von Willstätter und Steibelt und führte damit wieder die Größen „Sacharaseeinheit" und den „Sacharasewert" ein. Die praktisch erreichten Sacharasewerte waren sehr gering. Es kam vor allen Dingen auf die Auffindung eines unkomplizierten Reinigungsganges an. Infolgedessen wurde eine gewöhnliche Hefe mit verhältnismäßig geringer Invertasekonzentration als Ausgangsmaterial verwendet, während für die Erreichung hoher Sacharasewerte unter allen Umständen invertaseangereicherte Hefen, wie sie Willstätter beschreibt oder neuerdings Weidenhagen[2]) herstellt, verwendet werden müssen.

Die Herstellung des Rohsaftes geschah durch die von Willstätter ausgearbeitete fraktionierte Autolyse mit Phosphat aus frischer untergäriger Brauereihefe, die aus der Germania-Brauerei Münster stammte. Als sehr günstig zeigte es sich, daß die so hergestellten Rohsäfte über lange Zeit hin ihre volle Invertasewirkung behielten, so daß man auf einmal größere Saftmengen herstellen konnte und dann Monate hindurch denselben Ausgangssaft für die Arbeit hatte.

Zur Auffindung eines günstigen Reinigungsweges kombinierte man eine große Anzahl Adsorptionen miteinander.

So versuchte man z. B. den Rohsaft mit Tannin zu adsorbieren und eine Kaolinadsorption anzuschließen. Die Tanninadsorption mit geringen Mengen Tannin bewährte sich, da sie die Ausfällung des Eiweiß bewirkte und der Saft danach noch fast volle Aktivität

[1]) Sullivan und Tompson, Invertase, Il. of. Ceh, Soc. 57, 834 (1890).

[2]) Vortrag auf der Tagung der Verein. d. Chem., Köln, Juni 1934.

zeigte. Die Kaolinadsorption war so gedacht, daß dabei das Ferment an das Kaolin gehen sollte, es zeigte sich aber, daß bei nacheinander immer größeren Kaolinmengen wohl eine stetige Invertaseabnahme im überstehenden Saft zu verzeichnen war, daß aber zum Schluß noch zu bedeutende Mengen in Lösung verblieben.

Oder es wurde der tanninadsorbierte Saft drei Tage im rotierenden Dialysator durch Cellophan dialysiert. Die Messung und Bestimmung des Trockengewichtes zeigten immerhin einen erheblichen Unterschied gegenüber dem Rohsaft.

In einem weiteren Versuch schloß ich an die Tanninadsorption eine Tonerdeadsorption und an diese eine Elution an. Schon die Tonerdeadsorption zeigte nicht den gewünschten Erfolg, da noch größere Mengen Invertase in dem überstehenden Saft zurückblieben. Trotzdem wurde ein Elutionsversuch mit sekundärem Natriumphosphat angeschlossn, der jedoch nur ein schwaches Aktivitätsergebnis zeigte.

Es folgte ein Versuch, den Rohsaft erst mit Tannin und dann mit Kaolin zu behandeln. Dieser Weg stellte schon einen wesentlich besseren Reinigungsgang dar. Nach einer angeschlossenen Dialyse betrug das Trockengewicht nur noch $^1/_{10}$ von dem des Rohsaftes. Es wurde daher diese Adsorptionsfolge beibehalten und an sie noch eine Anzahl weiterer Operationen angeschlossen.

Zunächst engte man den dialysierten Saft ein. Die Methode von Jantzen und Schmalfuß[1]), die hierfür anfangs benutzt wurde, ließ sich durch eine neue, wesentlich einfachere sehr bald ersetzen. Diese bestand darin, daß man den Saft in einer großen flachen Schale einfüllte und 3 cm über dem Flüssigkeitsspiegel einen Ventilator rotieren ließ. In kurzer Zeit konnten auf diese Weise große Saftmengen eingeengt werden. Die Temperatur blieb durch die Wirkung der Verdunstungskälte dabei außerordentlich niedrig (12 °). Die so eingeengten Lösungen ergaben bei der Messung eine volle, der erhöhten Konzentration des Saftes entsprechende Invertase-Aktivität.

Mit dem konzentrierten stark wirksamen Saft wurden darauf einige Fällungsversuche vorgenommen. So mit Sublimatlösung, mit Phosphor-Wolframsäurelösung und mit Methanol. Lediglich der Methanolzusatz ließ einen weißlich gelben Niederschlag ausfallen. Nach dem Abzentrifugieren war weder der überstehende Saft noch der Niederschlag aktiv.

Im Gegensatz dazu zeigte der jetzt neu eingeschlagene Weg einer Tonerdeadsorption in konzentrierter Lösung gute Resultate; die Invertase ging fast ganz an die Tonerde, von der sie mit Ammoniak

---

[1]) Jantzen und Schmalfuß, Die chemische Fabrik, 2. Jahrg., S. 387.

wieder eluiert werden konnte. Der ganze Reinigungsweg sah danach folgendermaßen aus: Rohsaft . . . . Tanninadsorption . . . . Kaolinadsorption . . . . Einengen . . . . Dialyse . . . . Tonerdeadsorption . . . . Elution. Die Dialyse, die bisher nach der Tanninadsorption vorgenommen wurde, schloß sich jetzt an die Einengung des Saftes an, da es sich herausstellte, daß beim Dialysieren von größeren Saftmengen die Cellophanmembran zu stark beansprucht wurde und leicht zerriß.

Im Endergebnis dieses Reinigungsweges betrug das Trockengewicht des Eluates bei den besten Versuchen etwa 30mal weniger als das des Rohsaftes, bei höherer Wirksamkeit.

Es ist anzunehmen, daß der beschrittene Reinigungsweg, auf Invertase vorangereicherte Hefe angewandt, gute Sacharasewerte ergeben wird.

b) Versuchsteil.

Herstellung des Rohsaftes.

1000 Gramm Hefe wurden mit 60 bis 80 Gramm sekundärem Phosphat bis zur Verflüssigung geknetet und zum Vorautolysieren in einen Thermostaten von 30 ° gehängt. Nach 2 bis 3 Stunden füllte man auf 3000 ccm auf, mischte gut durch und zentrifugierte von den Heferückständen ab. Diese wurden hierauf mit ebensoviel Wasser von 30 °, wie zuvor angewandt, gewaschen und nach dem Abschleudern des Waschwassers abermals 3000 ccm aufgefüllt. Die Autolyse nahm dann bei 30 ° ihren Fortgang. Die Dauer betrug 14 bis 16 Stunden. Nach dieser Zeit wurde abzentrifugiert und der überstehende fertige Rohsaft unter einer Toluolschicht im Eisschrank aufbewahrt.

Versuch 1.

Messung des Rohsaftes.

Zu der Invertasebestimmung dienten 2 ccm Rohsaft, die eine Halbspaltungszeit tv von 44,56 ergaben.

Die Trockengewichtsbestimmung, die mit 20 ccm vorgenommen wurde, betrug 368,4 mg in 20 ccm Saft oder 36,84 mg in 2 ccm. Daraus errechnete sich der Sacharasewert zu

$$\text{S.-W.} = \frac{1}{\text{tv} \cdot \text{mg} \cdot 0{,}332} = \frac{1}{44{,}56 \cdot 36{,}84 \cdot 0{,}332}$$

$$= \textbf{S.-W.} = \textbf{0,00183}$$

Versuch 25.

Messung des tanninadsorbierten, kaolinadsorbierten Saftes.

Die Menge Tanninlösung (5prozentig) wurde solange variiert, bis man genau herausfand, bei welcher ccm-Anzahl gerade sämtliches

Eiweiß fiel, aber kein Tanninüberschuß in Lösung blieb. In diesem Falle waren es 0,14 ccm Tanninlösung auf 10 ccm Saft. Die Aktivität des tanninadsorbierten Saftes kam meistens der des Rohsaftes gleich. Die angeschlossenen Kaolinadsorptionen mit 0,4, 1 und 2 Gramm Kaolin auf 10 ccm Saft zeigten in der überstehenden Lösung einen Invertaseabfall bis zu 66 %, wenn man den Sacharasegehalt des Tannin absorbierten Saftes mit 100 % bezeichnete.

Tanninabsorbierter Saft = S.-E. 0,0267 = 100 %
0,4 g Kaolin ads. auf 10 = S.-E. 0,0242 = 90,6 %
1 g Kaolin ads. auf 10 = S.-E. 0,0230 = 86,2 %
2 g Kaolin ads. auf 10 = S.-E. 0,0176 = 65,9 %

Eine Elution von Kaolin lohnte also nicht, da die größte Menge Ferment in Lösung blieb.

Versuch 37.

Messung des tanninadsorbierten dialysierten Saftes.

Die Tanninadsorption erfolgte mit 0,14 ccm 5prozentiger Tanninlösung auf 10 ccm Saft. Dialysiert wurde anschließend zwei Tage im rotierenden Dialysator durch Cellophan, wobei alle sechs Stunden das Wasser gewechselt wurde.

Die Invertasemessung, die mit 2 ccm dialysiertem Saft erfolgte, ergab eine Halbspaltungszeit tv = 79,7.

Das Trockengewicht betrug in 2 ccm Saft 33,82 mg. Daraus folgte der Sacharasewert:

$$\text{S.-W.} = \frac{1}{\text{tv} \cdot \text{mg} \cdot 0{,}332} = \frac{1}{79{,}78 \cdot 33{,}82 \cdot 0{,}332}$$

S.-W. = 0,012

Die schwache Aktivität des Dialysates ist der Grund für den geringen Sacharasewert.

Versuch 11.

Messung des tannin-tonerde-adsorbierten eluierten Saftes.

Die Tonerdeadsorption des tanninadsorbierten Saftes erfolgte mit 3 ccm Tonerde auf 10 ccm Saft. Die überstehende Lösung war noch stark aktiv. Der mit 0,3prozentiger Na_2HPO_4-Lösung angeschlossene Elutionsversuch hatte daher keine Bedeutung. Die Drehung des Eluates betrug nach 45 Minuten D = 4,8.

Versuch 12.

Messung des tanninadsorbierten, kaolinadsorbierten dialysierten Saftes.

Die an die Tanninadsorption (0,14 auf 10 ccm) angeschlossene Kaolinadsorption nahm man mit 0,5 Gramm Kaolin auf 10 ccm Saft

vor. Nach dreitägiger Dialyse ergab die Messung tv = 93,19. Das dazu gehörige Trockengewicht in 2 ccm Saft 2,16 mg und der Sacharasewert

$$S.\text{-}W. = \frac{1}{93{,}19 \cdot 2{,}16 \cdot 0{,}332} = \mathbf{0{,}014}$$

Versuch 14.

Einengen des tanninadsorbierten, kaolinadsorbierten dialysierten Saftes.

1500 ccm mit Tannin-Kaolin adsorbierten Saftes wurden in eine flache Schale gefüllt und durch einen 1 cm über dem Flüssigkeitsspiegel angebrachten Ventilator eingeengt. Die Methode gestattete, in einer Stunde 75 ccm Saft zum Verdunsten zu bringen und war dabei trotzdem außerordentlich schonend, also für Fermentarbeiten besonders geeignet, da die Temperatur nur 8 bis 10° betrug.

Nachdem auf 100 ccm eingeengt war, ergab die Messung mit 1 ccm Saft eine Halbspaltungszeit tv = 18,06, während sie vor dem Einengen bei Anwendung von **3 ccm** zur Messung 57,5 betrug.

Die Aktivität war also während des Eindampfens voll erhalten geblieben und dem Maße der Konzentrationserhöhung entsprechend gestiegen.

Versuch 24.

Reinigungsgang, bestehend in Tanninfällung, Kaolinadsorption, Einengen, Dialysieren, Tonerdeadsorption und Elution.

Die ersten Stufen des Reinigungsganges sind bereits bekannt, die Tanninadsorption erfolgte wieder mit 0,14 ccm auf 10 ccm Saft, die Kaolinadsorption mit 0,5 Gramm auf 10 ccm Saft. Eingeengt wurde von 1500 ccm auf 100. — Die nun neu angeschlossene Tonerdeadsorption in konzentrierter Fermentlösung nahm man mit 3 ccm Tonerde C vor. Nach zweimaligem guten Waschen eluierte man mit 0,05 prozentigem Ammoniak. Die Messung mit 5 ccm des Eluates ergab ein tv von 36,04 bei einem Trockengewicht von 2,5 mg in 5 ccm.

Das ergibt einen Sacharasewert von **0,033** gegenüber dem des Rohsaftes von 0,0018.

Versuch 27.

Ein weiterer Versuch, der in genau der gleichen Weise wie Versuch 7 vorgenommen wurde, ergab nach der Elution einen Sacharasewert von **0,077.** Das bedeutet im Vergleich zu dem des Rohsaftes, der 0,0018 betrug, eine 43fache Reinigung.

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Privatdozenten Dr. Wolfgang Langenbeck, meinen herzlichen Dank für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge aussprechen.

Der Germania-Brauerei, insbesondere Herrn Dr. Hallermann, sind wir stets zu Dank verpflichtet für die uns in freundlicher Weise zur Verfügung gestellte Hefe.

Lebenslauf.

Am 5. April 1909 wurde ich, Otto Schaefer, als Sohn des Fabrikdirektors Otto Schaefer und seiner Ehefrau, Elli Schaefer, geb. Kolbe, in Schöningen (Braunschweig) geboren. Nach dreijähriger Vorschule besuchte ich das Humanistische Gymnasium in der benachbarten Kreisstadt Helmstedt und erhielt Ostern 1927 das Reifezeugnis. Ich studierte darauf Chemie an den Universitäten Freiburg, Bonn, Göttingen und Münster und bestand im Dezember 1932 mein zweites chemisches Verbandsexamen. Seitdem war ich mit der Anfertigung meiner chemischen Doktorarbeit beschäftigt.

O. Schaefer.